取扱説明書

ReproXF™

Cat.# RCHEMD007

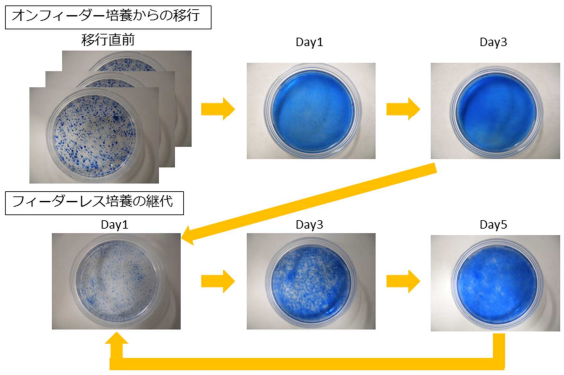

Fig. 1 ReproXF™での培養の概要

本製品をご使用の際は以下の点にご注意ください。

① オンフィーダーからReproXF™（フィーダーレス）への移行の際は、オンフィーダー培養中のディッシュ3枚分（コロニーが底面積の30%程度を覆った状態のもの（Fig. 2））を集めてディッシュ1枚に全量移行してください。通常の継代時のように x1/3 量をディッシュ1枚に播種した場合、細胞が生存できず培養がうまくいきません。

② ReproXF™ （フィーダーレス）の継代は、細胞のコロニーがディッシュ底面積の85%以上になった時に行なってください（Fig. 3)。播種密度が低い状態で継代すると、うまく継代できなくなります。継代時の細胞数の播種細胞数の目安は $4.5x10^4$ cells/cm^2 です。

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

保存方法

本品は冷凍状態で発送されます。到着後すみやかに-20℃で保存して下さい。使用前に解凍し、解凍後は2～8℃で保存して下さい。小分け保存する場合は、小分け後、-20℃で保存してください。解凍後は2週間を目安に使い切って下さい。なるべく凍結融解は繰り返さないで下さい。

特長

・動物由来成分は不含です（Xeno-free）。
・フィーダー細胞は不要です。
・ヒトiPS細胞(Takahashi, K., et al., *Cell*, 131, 861-72, 2007)でロット試験済みです。
・浸透圧、pH、滅菌、マイコプラズマ検査済みです。
・毒劇物成分は不含です。

ReproXF™を用いた培養方法の概要

複数のコーティング剤と剥離剤の組み合わせで培養を行なえることを確認しています。培養可能なコーティング剤と剥離剤については下記を参考してください。

剥離剤：EDTA, Accutase
コーティング剤：VTN-N, Laminin-5, Matrigel*, SynthemaxII*
*:スクレーパー使用

必要な試薬および消耗品

・本品：ReproXF™に10 ng/mL bFGF（RCHEOT002, 003）を添加したもの（以下、これらを「ReproXF™」と総称する）。
・Primate ES Cell Medium (RCHEMD001)
・0.5 mM EDTA
・Vitronectin, truncated recombinant human (VTN-N) (Invitrogen, A14701SA)
・Laminin-5 （RCHEOT004)
・マトリゲル (Corning, 354277)
・ESGRO Complete Accutase (Millipore, SF006)
・Y-27632 (Wako, 257-00511)
・PBS (-) : Ca^{++}, Mg^{++}-free PBS
・60 mm 細胞培養ディッシュ
・ReproCoat™ (RCHEOT001)コートディッシュ、または0.1%ゼラチンコートディッシュ
・その他培養操作に通常必要なもの

剥離液と培地は室温で使用してください。
コーティング剤は4℃で使用してください。

目次

A：ディッシュのコーティング方法
A1：VTN-Nをご使用の場合
A2：Laminin-5をご使用の場合
A3：マトリゲルをご使用の場合
A4：SynthemaxII-SCをご使用の場合
B：ReproXF™培養への移行方法
B1：オンフィーダー培養からReproXF™培養への移行方法
B2：フィーダーレス培養からReproXF™培養への移行方法
C：ReproXF™培養の継代方法
C1：EDTAによる剥離
C2：Accutaseによる剥離
D：よくある質問

A：ディッシュのコーティング方法

A1: VTN-N をご使用の場合

＜VTN-N の分注＞

A1-1、VTN-N を室温で解凍します。

A1-2、ポリプロピレンチューブに 120 µL ずつ分注します。

A1-3、使用時まで、-80℃で保存します。

＜コーティング（60 mm ディッシュ 4 枚分)＞

A1-4、分注したチューブを室温で解凍します。

A1-5、15 mL チューブに PBS (-)を 8 mL 加えます。

A1-6、準備した PBS (-) 8 mL に 120 µL の VTN-N を懸濁し 67 倍希釈液を作ります。

A1-7、60 mm ディッシュに 2 mL ずつ加え、全体に行き渡らせます。

A1-8、室温で 1 時間静置します。すぐに使用しない場合はパラフィルムでシールし、4℃で保存できます（1 週間を目安にご使用下さい）。

A2：Laminin-5 をご使用の場合

60 mm ディッシュあたり、4 µg の Laminin-5 でコートして下さい。

A2-1、Laminin-5 を 4℃または氷上で融解しておきます（手で溶かすことや室温に放置して溶かすことはしないで下さい）。

A2-2、60 mm ディッシュに 2 mL の PBS（-）を入れておきます。
（Laminin-5 の入った vial に絶対に PBS（-）を加えないで下さい）

A2-3、融解した Laminin-5 を原液のまま直接ディッシュに加え、素早くディッシュを 10 回程度ゆらし、全体に行きわたらせます（Laminin-5 は吸着性が非常に強い物質です。チップへの吸着を避けるため、ピペッティングはおこなわないでください）

A2-4、4℃で一晩、または 37℃で 2 時間インキュベートしコーティングします。

A2-5、すぐに使用しない場合はパラフィルムでシールし、4℃で保存できます（1 週間を目安にご使用下さい）。

A3：マトリゲルをご使用の場合

＜マトリゲルの分注＞

A3-1、マトリゲルを冷蔵庫で一晩かけて解凍します。泡立たせないようにボトルを回して撹拌します。温度が上がるとゲル化するので注意して下さい。

A3-2、15 mL チューブとチップを十分に冷やしておきます。

A3-3、解凍したマトリゲルをゲル化させないように氷上で、15 mL チューブに 400 µL ずつ分注します。

A3-4、パラフィルムでシールし、-80℃で保存します。

＜コーティング（60 mm ディッシュ 6 枚分)＞

A3-5、分注したチューブを冷蔵庫で一晩かけて解凍します。

A3-6、粘性はあるがゲル状のものが見えないことを確認し、DMEM 等の基礎培地（血清不含）を 11.6 mL 加え 30 倍希釈します。泡立てないようにゆっくりピペッティングします。

A3-7、30 倍希釈したマトリゲルを 60 mm ディッシュに 2 mL 加え、ピペットマンで全体に行き渡らせます。

A3-8、パラフィルム等でシールし、室温で 3 時間程静置します。すぐに使用しない場合はそのまま 4℃で保存できます。

A4：SynthemaxII-SC をご使用の場合

＜Reconstitution＞

A4-1、10 mL のピペットを用いて、Corning SynthemaxII-SC Substrate のバイアル瓶に 10 mL の滅菌水を加える。

A4-2、数回ピペッティングを行い、バイアル瓶の内壁を洗い、パウダーを完全に溶かす。これによって、1 mg/mL に調製された SynthemaxII-SC ストック溶液を作成する。

A4-3、SynthemaxII-SC ストック溶液は、4℃で 6 ヶ月間保存できます。

＜コーティング＞

A4-4、SynthemaxII-SC ストック溶液を滅菌水で 40 倍希釈し、終濃度 0.025 mg/mL の SynthemaxII-SC 希釈溶液を作成する。

A4-5、SynthemaxII-SC 希釈溶液を 60 mm ディッシュに 2 mL 加え、ピペットマンで全体に行き渡らせます。

A4-6、フタをして、室温で 2 時間静置します。

A4-7、アスピレーターで完全に溶液を除きます。

A4-8、コートしたディッシュはすぐに使用できます。すぐに使用しない場合は、4℃で 3 ヶ月間保存できます。

B：ReproXF™ 培養への移行方法

B1：オンフィーダー培養から ReproXF™ 培養への移行方法（60 mm ディッシュの場合）

(移行のタイミング)

注１）オンフィーダー培養で、ヒト ES/iPS 細胞のコロニーがディッシュ底面に対して 30%程度を覆うのを目安に継代を行ってください（Fig. 2)。ディッシュ 3 枚分の細胞をまとめてディッシュ 1 枚に移行してください。移行時の細胞数が少ない場合、うまく移行できない可能性が高いのでご注意ください。

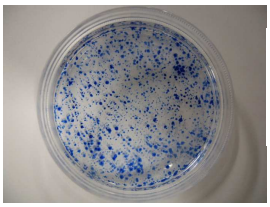

Fig. 2 フィーダーレス培養へ移行時のコロニーの密度の様子。移行時のタイミングのディッシュを ALP 染色したもの。

注２）移行時、フィーダー細胞を極力除くために、ReproCoat™ でコートしたディッシュ及びゼラチンでコートしたディッシュを用いたフィーダー細胞の除去法を推奨しております。移行の前に、ReproCoat™ でコートしたディッシュ、または 0.1%ゼラチンでコートしたディッシュをご準備ください。

B1-1、Primate ES Cell Medium でオンフィーダー培養しているヒト ES/iPS 細胞の 60 mm ディッシュ 3 枚を使用します。
B1-2、オンフィーダー培養中のディッシュから Primte ES Cell Medium を除き、PBS (-) 4 mL で細胞を洗います。
B1-3、PBS (-) を除去し、Accutase をディッシュに 1 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃で 10 分放置します。
B1-4、Accutase は除去せず、P-1000 のピペットマンを使用し、ピペッティングにより細胞をシングルセルにし、15 mL チューブに回収します。
B1-5、Primate ES Cell Medium を 2 mL 加え、ディッシュに残った細胞を 15 mL チューブに回収します。
B1-6、ディッシュ 3 枚の細胞全量を、1 本の 15 mL チューブに回収します。この時、フィーダー細胞は持ち込まれた状態でも問題ありません。
B1-7、300 x g、5 分間、室温で遠心後、上清を可能な限り除去します。
B1-8、Primate ES Cell Medium を 4 mL 加え、ピペッティングを 2 回行い、細胞を懸濁します。
B1-9、事前に準備した ReproCoat™ またはゼラチンでコーティングしたディッシュから溶液を除去し、細胞懸濁液を全量播種します。**この時、終濃度が 10 μM になるように Y-27632 を添加してください。**
B1-10、37℃、5%CO_2 インキュベーターで 2 時間培養します。
注３）この操作で、フィーダー細胞はディッシュに接着しますが、ヒト ES/iPS 細胞は接着せず浮遊しているか、フィーダー細胞にゆるく接着した状態にあります。この操作によって、フィーダー細胞の持込を可能な限り減らすことが重要です。
B1-11、浮遊しているヒト ES/iPS 細胞塊を、15 mL チューブに回収します。
B1-12、Primate ES Cell Medium を 2 mL 添加し、フィーダー細胞にゆるく接着しているヒト ES/iPS 細胞塊を、ピペッティングにより剥がし 15 mL チューブに回収します。
B1-13、300 x g、5 分間、室温で遠心後、上清を可能な限り除去します。
B1-14、ReproXF™ を 4 mL 加え、ピペッティングを 2 回行って細胞を懸濁します。操作 A でコーティングしたディッシュからコーティング溶液を除去し、細胞懸濁液を全量播種します。
B1-15、細胞が均一になるようにディッシュをゆらし、37℃、5%CO_2 インキュベーターで一晩培養します。**この時、終濃度が 10 μM になるように Y-27632 を添加してください。培地交換時には、Y-27632 の添加は不要です。**
B1-16、翌日から毎日 1 回の培地交換を行います。移行翌日にディッシュ底面の大部分を細胞が占めますが、問題ありません。
B1-17、移行後 3 日目に継代を行います。移行時は株によってはすぐに馴化せず、培養が安定しない場合がありますので、**移行後最初の継代時は、希釈率を 1:1 で継代してください。**その後、4 回目の継代までは 1:2 の希釈率での継代を行ってください。培養が安定しますと、1:3～1:4 での希釈率での継代が可能です。

B2：フィーダーレス培養から ReproXF™ 培養への移行方法（60 mm ディッシュの場合）

これまでご使用いただいていた培地で継代のタイミングになった細胞をご準備ください。移行時に 4.5 x 10^4 cells/cm^2 で播種していただくための細胞数が必要です。
B2-1、操作 A でコーティングしたディッシュからコーティング溶液を除去し、ReproXF™ を 3 mL 加えます。
B2-2、フィーダーレス培養中のディッシュから培地を除き、PBS (-) 4 mL で細胞を洗います。
B2-3、PBS (-)を除去し、Accutase をディッシュに 1 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃で 10 分放置します。
B2-4、Accutase は除去せず、P-1000 のピペットマンを使用し、ピペッティングにより細胞をシングルセルにし、15 mL チューブに回収します。
B2-5、RerproXF™ をディッシュに 2 mL 加え、ディッシュに残った細胞を 15 mL チューブに回収します。
B2-6、細胞数を計数するために、細胞懸濁液から 10 μL サンプリングします。
B2-7、300×g、5 分間、室温で遠心します。
B2-8、遠心している間に、ステップ B2-6 でサンプリングした懸濁液で細胞数を計数します。
B2-9、遠心後の15 mLチューブから上清を除き、新しいReproXF™を加え、細胞懸濁液を**1 x 10^6 cells/mL**になるように調整します。
B2-10、細胞懸濁液から1 mLをB2-1で準備したディッシュに播種します。**この時、終濃度が10 μMになるようにY-27632を添加してください。培地交換時には、Y-27632の添加は不要です。**
B2-11、37℃、CO_2 インキュベーターにて一晩培養します。
B2-12、翌日から毎日 1 回の培地交換を行います。
B2-13、移行後 7 日目に継代を行います。移行時は株によってはすぐに馴化せず、培養が安定しない場合がありますので、**移行後最初の継代時は、希釈率を 1:1 で継代してください。**その後、4 回目の継代までは 1:2 の希釈率での継代を行ってください。培養が安定しますと、1:3～1:4 での希釈率での継代が可能です。

C：ReproXF™ 培養の継代方法

C1：EDTA による剥離

(継代のタイミング)

注４）iPS 細胞のコロニーがディッシュ底面に対して 85%以上を覆うのを目安に継代を行ってください（Fig. 3)。継代後、通常 4-5 日間の培養で継代のタイミングになります。継代のタイミングはご使用される細胞株により異なる可能性がありますので、細胞密度が 85%に満たない場合は、さらに培養期間を延長して様子を見てください。
C1-1、フィーダーレス培養中のディッシュから ReproXF™ を除き、PBS (-) 4 mL で細胞を洗います。
C1-2、PBS (-)を除去し、再度 PBS (-)を 4 mL 加え、細胞を洗います。
C1-3、PBS (-)を除去し、0.5 mM EDTA をディッシュに 2 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、室温で 6 分放置します。この時、顕微鏡で細胞シートの縁がめくれ上がってきていることを確認してください。

注５）EDTA で処理する時間は、ご使用される細胞株によって異なる可能性があります。
C1-4、EDTA を除去し、新しい ReproXF™を 2 mL 加えます。
C1-5、5 mL のディスポーザルピペットを用いて、ピペッティングによって細胞を剥離し、15 mL チューブに細胞を回収します。同じ培地を使ってのピペッティングの回数は３回までにしてください。**ピペッティングによって、うまく細胞が剥がれない場合は、セルスクレーパーを使用して細胞を剥離してください。**
C1-6、新しく ReproXF™を 2 mL 加え、C1-5 と同様に回収操作を行ってください。剥離処理が不十分な場合、細胞が剥がれにくいことがあります。この時、剥がしにくい細胞は無理にピペッティングにより剥がさず、セルスクレーパーを使用して剥がしてください。
C1-7、再度、新しく ReproXF™を 2 mL 加え、C1-5 と同様に回収操作を行ってください。回収操作は計 3 回行ってください。
注６）ステップ C1-4 から C1-7 の操作は 2 分程度を目安に行ってください。EDTA 除去後に培地を加えると、細胞の再接着が始まりますので、時間をかけずに操作を行う必要があります。
C1-8、100×g、2 分間、室温で遠心します。
C1-9、上清を除き、新しい ReproXF™を 12 mL 加え、ディスポーザブルのピペットでピペッティングをゆっくり３回行い、細胞を再懸濁します。この時、シングルセルの状態にはしないようにご注意ください。
C1-10、操作 A で準備した Laminin-5/VTN-N コートディッシュから溶液を除き、細胞懸濁液を 4 mL 播種します。**この時、終濃度が 10 μM になるように Y-27632 を添加することで、生存率を高めることができます。**
Y-27632 は添加しなくても培養可能です。
C1-11、細胞が均一になるようにディッシュに広げ、37℃、5%CO_2インキュベーターで一晩培養します。
C1-12、毎日、全量 4 mL を培地交換します。培地交換時には、Y-27632 の添加は不要です。
C1-13、4-5 日間培養後に、細胞密度が底面積の 85%程度になりますので、次の継代を行います（Fig. 3）。4-5 日間培養後に細胞密度が 85%に満たない場合は、さらに培養期間を延長して様子を見てください。

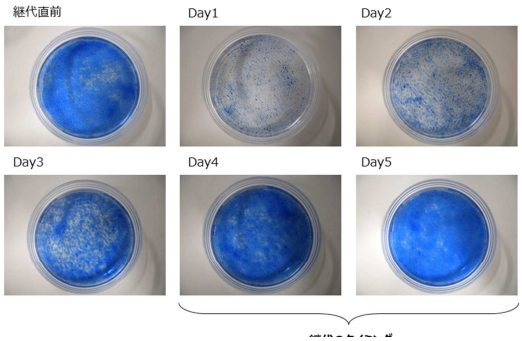

Fig. 3 ReproXF™ を使用したフィーダーレス培養時の経時変化の様子。iPS 細胞を ALP 染色したもの。継代後、4 日～5 日くらいが継代のタイミング（EDTA による継代）。

C2：Accutase による剥離

（継代のタイミング）
注７）iPS 細胞のコロニーがディッシュ底面に対して 85%以上を覆うのを目安に継代を行ってください（Fig. 3）。継代後、通常 4-5 日間の培養で継代のタイミングになります。継代のタイミングはご使用される細胞株により異なる可能性がありますので、細胞密度が 85%に満たない場合は、さらに 1 日培養を行って様子を見てください。
C2-1、操作 A でコーティングしたディッシュからコーティング溶液を除去し、ReproXF™を 3 mL 加えます。
C2-2、フィーダーレス培養中のディッシュから ReproXF™を除き、PBS (-) 4 mL で細胞を洗います。
C2-3、PBS (-) を除去し、Accutase をディッシュに 1 mL 加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにした後、37℃で 10 分放置します。
C2-4、Accutase は除去せず、P-1000 のピペットマンを使用し、ピペッティングにより細胞をシングルセルにし、15 mL チューブに回収します。
C2-5、RerproXF™をディッシュに 2 mL 加え、ディッシュに残った細胞を 15 mL チューブに回収します。
C2-6、細胞数を計数するために、細胞懸濁液から 10 μL サンプリングします。
C2-7、300×g、5 分間、室温で遠心します。
C2-8、遠心している間に、ステップ C2-5 でサンプリングした懸濁液で細胞数を計数します。
C2-9、遠心後の15 mLチューブから上清を除き、新しいReproXF™を加え、細胞懸濁液を**1 x 10^6 cells/mL**になるように調整します。
C2-10、細胞懸濁液から1 mLをC2-1で準備したディッシュに播種します。**この時、終濃度が10 μMになるようにY-27632を添加してください。培地交換時には、Y-27632の添加は不要です。**
C2-11、37℃、CO_2インキュベーターにて一晩培養します。
C2-12、翌日から毎日 1 回の培地交換を行います。

D：よくある質問

Q1.継代後、3 日以内にディッシュ底面の 85%以上が細胞で覆われた場合、どうすれば良いですか？
A1. 培養期間はあくまで目安となっております。細胞がディッシュ底面の 85%以上を覆ったタイミングで、培養期間にこだわらず継代を行ってください。
Q2. 4-5 日間培養してもディッシュ底面を覆い尽くすほどには、細胞が増えていないのですが？
A2. 培養期間を延長して様子を見てください。細胞が増えてこない場合、播種時の細胞数が少なかった可能性があります。継代時の播種細胞数を増やしてみてください。細胞数の目安は 1x10^6 cells/60 mm ディッシュになります。
Q3. オンフィーダー培養からの移行時にフィーダー細胞を持ち込んでも問題ないですか？
A3. フィーダー細胞の持ち込みは極力減らすようにしてください。フィーダー細胞が持ち込まれると細胞の状態が悪くなる傾向にあります。
Q4. 60 mm ディッシュ 3 枚分は、100 mm ディッシュ 1 枚で代用可能ですか？
A4. 代用可能です。100 mm ディッシュでディッシュ底面の 30%程度を覆った状態のものを、60 mm ディッシュ 1 枚に移行してください。
Q5. 継代時の EDTA 処理で、5 分間処理したところ、ほとんどの細胞が剥がれて浮いてしまったのですが、どうすれば良いですか？
A5. EDTA の処理時間を 5 分より短くしてください。細胞が浮かび上がった場合は、EDTA ごと細胞を全量回収し、後の操作を行ってください。
Q6. EDTA 処理後にうまく細胞が剥がれないのですが、どうすればよいですか？
A6. EDTA の処理時間を少し長くしてください。EDTA 除去後、培地添加から剥離までの操作は手早く行ってください。培地添加後、2 分以内を目安に作業を行ってください。ピペッティングにより剥がれない細胞は無理にピペッティングで剥がさず、セルスクレーパーを使用して剥がしてください。

株式会社リプロセル
https://www.reprocell.com
E-mail: info_jp@reprocell.com